

I 742

EN 30-99 DE



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 39 119 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 197 39 119.2
㉑ Anmeldetag: 6. 9. 97
㉒ Offenlegungstag: 11. 3. 99

⑤1 Int. Cl.⁶:
B 01 L 3/00
G 01 N 1/28 PT
G 01 N 21/62
G 01 N 21/76
G 01 N 33/52
// G 01 N 21/64, 21/76,
33/49

DE 197 39 119 A 1

㉓ Anmelder:
Friedrich-Schiller-Universität Jena, 07743 Jena, DE

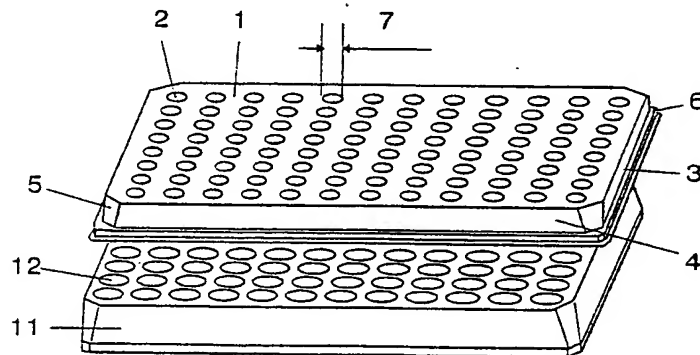
㉔ Erfinder:
Rhode, Heidrun, Dr.med.habil., 07778 Hainichen,
DE; Horn, Anton, Prof. Dr.med.habil., 07749 Jena,
DE; Scharff, Max, 99887 Catterfeld, DE; Wölfel,
Helmut, 07751 Sulza, DE

sp. 3, 24. 42 ff

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤4 Mikrotiterplatte

⑤7 Die Erfindung betrifft eine Mikrotiterplatte, insbesondere zur Behandlung von Proben mit organischen Lösungsmitteln und zur Analyse mittels lichterzeugender Verfahren, mit in einem an sich bekannten Raster, beispielsweise $n \times 8 \times m \times 12$, angeordneten Probengefäßen. Aufgabe ist es, eine aufwandgering herstellbare und gut handhabbare Mikrotiterplatte zu schaffen, die für eine Vielzahl unterschiedlichster Screening-Untersuchungen, einschließlich Fluoreszenz- und Lumineszenzmessungen, unter den jeweils spezifischen Anwendungsbedingungen, wie Lösungsmiteinsatz etc., universell anwendbar ist. Die Mikrotiterplatte soll trotz kleiner Volumina ($< 100 \mu\text{l}$) der Analysengefäße problemlos, z. B. mit Filterpapierstanzlingen, beschickbar sein. Erfindungsgemäß besteht die Mikrotiterplatte (1) aus lichtundurchlässiger, nichtfluoreszierender und gegen organische Lösungsmittel resistenter formnachgiebiger Thermoplaste, wie thermisch verformbares Polypropylen, und besitzt, vorzugsweise durch thermische Abformung von einer Matrize herstellbare, kegelstumpfförmige Probengefäße (2) zur Aufnahme von festen und flüssigen Proben im Mikroliter-Voluminabereich. Vorteilhaft ist eine Stabilisierungsplatte (11) zur Aufnahme und ggf. Temperierung der Mikrotiterplatte (1), wobei die Mikrotiterplatte (1) zweckmäßig mit Hilfe einer Auswurfplatte (13) wieder separiert werden kann.



BEST AVAILABLE COPY

DE 197 39 119 A 1

Die Erfindung betrifft eine Mikrotiterplatte, insbesondere zur Behandlung von Proben mit organischen Lösungsmitteln und deren Analyse mittels lichterzeugender Verfahren. Sie findet Verwendung in der biochemischen und immunologischen Forschung, in der medizinischen Diagnostik, in der chemischen und pharmazeutischen Industrie sowie in der Biotechnologie.

Mikrotiterplatten, die eine Pluralität von Probengefäßen in einem dem Koordinatenraster von Multipipetten entsprechenden Raster, beispielsweise 8×12 oder $n \times m \times 12$, aufweisen, gewinnen in der Analytik zunehmend an Bedeutung. Ihr Vorteil liegt darin, daß eine Vielzahl von gleichen oder unterschiedlichen Proben, einschließlich Referenzlösungen, parallel behandelt und ausgewertet werden können. In letzter Zeit kommen mehr und mehr fluorimetrische und luminometrische Untersuchungen in Verbindung mit der Mikrotiterplattentechnologie, insbesondere wegen ihrer hohen Empfindlichkeit, zum Einsatz.

Derartige Mikrotiterplatten sind für viele Anwendungen an sich bekannt [z. B. A. Yamaguchi et al., Clin. Chem. 35 (1989) 1962–1964, T. Tuuminen et al., Clin. Chim. Acta 212 (1992) 155–158] und bestehen insbesondere aus Polystyrol.

Bei Screeninguntersuchungen unter Verwendung stark gefärbter Proben, insbesondere von Blutproben, kommt es zu einer erheblichen Einengung der Anwendbarkeit optischer Analyseverfahren, da die analysierte Lichtintensität durch die Probe stark verfälscht wird und es daher zu einer bedeutenden Senkung der Empfindlichkeit kommt. Sehr häufig lassen sich die störenden Substanzen, wie beispielsweise Hämoglobin, elegant mit organischen Lösungsmitteln fällen, d. h. entweißen, und die besagten Störungen dadurch beheben oder zumindest stark vermindern. Neben dieser Art der Screeninguntersuchung werden gegenwärtig in zunehmenden Maße Verfahren entwickelt, die durch Naturoffscreening und kombinatorische Chemie die effiziente Entwicklung neuer oder die Verbesserung bekannter Pharmaka erlauben. Sehr häufig müssen die zu screenenden Proben mit organischen Lösungsmitteln behandelt und danach analysiert werden.

Die gegenwärtig verfügbaren Mikrotiterplatten erfüllen die Anforderungen, die durch Hochdurchsatzscreening-Projekte gestellt werden (z. B. Nutzungsmöglichkeit für gefärbte Proben, ökonomisch vertretbaren Einsatz von teuren, hochstandardisierten Reagenzien und die praktikable Verwendbarkeit von Trockenproben auf Trägern, wie Filterpapier-Stanzlingen) nicht. Für den die Analysenkosten und die Reagenzienvolumina reduzierenden Mikroliterbereich sind keine lösungsmittelbeständigen mit optischen Mitteln analysierbaren Mikrotiterplatten verfügbar.

Einerseits bestehen die bisher bekannten, zur miniaturisierten Analyse mit optischen Mitteln geeigneten Mikrotiterplatten mit kleinen Höhlungen, alle aus Polystyrol und schließen wegen der Unverträglichkeit gegenüber Lösungsmitteln eine Analyse nach Lösungsmittel-Extraktion praktisch aus, wobei darüber hinaus übliche Filterpapierstanzlinge von auf Filterpapier aufgetrockneten Blutproben nicht problemlos und praktikabel in die bekannten Aufnahmegefäße der Mikrotiterplatte eingebracht werden können.

Andererseits sind lösungsmittelbeständige herkömmliche Mikrotiterplatten (z. B. Fa. Greiner) relativ teuer, aufgrund ihrer Transparenzeigenschaften nicht für alle optischen Analyseverfahren geeignet und erfordern außerdem große Probenvolumina und damit Reagenzien-Mengen. Diese Mikrotiterplatten sind auf Grund der zu erwartenden hohen Kosten für Screening-Untersuchungen ebenfalls nicht geeignet.

Der Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zu Grunde, eine mit geringem Aufwand herstellbare und gut handhabbare Mikrotiterplatte zu schaffen, welche die vorgenannten Nachteile in der Gesamtheit nicht aufweist und damit für eine Vielzahl unterschiedlichster Screening-Untersuchungen, insbesondere mit Einsatz von Fluoreszenz- und Luminenzmessungen, universell anwendbar ist. Die Mikrotiterplatte soll trotz kleiner Volumina der Analysengefäße problemlos, z. B. mit Filterpapierstanzlingen, beschickbar sein.

Erfindungsgemäß wird eine Mikrotiterplatte vorgeschlagen, die aus lichtundurchlässiger, nichtfluoreszierender und gegen organische Lösungsmittel resistenter formnachgiebiger Thermoplaste, wie thermisch verformbares Polypropylen, besteht und bei welcher die, vorzugsweise durch thermische Verformung hergestellten, Probengefäße, kegelschumpfförmig für Probenvolumina im Mikroliterbereich ausgebildet sind.

In den Unteransprüchen 2 bis 8 sind zweckmäßige Ausgestaltungsmerkmale der Erfindung, wie Mittel zur Erhöhung der mechanischen Stabilität, zur Erweiterung der Anwendungsmöglichkeiten und zur Verbesserung der Handhabung, beschrieben.

Die Mikrotiterplatte kann auf einfachste Weise und damit sehr wirtschaftlich, beispielsweise durch thermische Abformung von einer Matrice (Master) hergestellt werden und ist auf Grund ihrer Material- und Formeigenschaften der Probengefäße universell für zumindest eine Vielzahl von Anwendungen zur Probenbehandlung und Probenauswertung geeignet. Diese Anwendungen schließen auch optische Auswerteverfahren mit ein, ohne daß die Materialeigenschaften der Mikrotiterplatte die Empfindlichkeit der Auswertung beeinträchtigen. Durch die kegelschumpfförmige Form der Probengefäße wird eine gute und praktikable Beschickung der Probengefäße gewährleistet, wobei auch Partikel, wie Filterpapierstanzlinge etc., trotz der kleinen Gefäßvolumina ebenfalls mit inbegriffen sind. Die geringen Voluminagrößen gestatten außerdem eine sehr kostengünstige Probenauswertung.

In der Gesamtheit vereinigt die Mikrotiterplatte dabei einzelne Vorteile speziell für bestimmte Anwendungsfälle bereits bekanntgewordener Mikrotiterplatten für eine breite und universelle Anwendbarkeit unter verschiedensten Nutzungsvoraussetzungen.

Die Erfindung soll nachstehend anhand der Zeichnung näher erläutert werden. Es zeigen:

Fig. 1 Perspektivdarstellung der Mikrotiterplatte mit Stabilisierungsplatte

Fig. 2 Mikrotiterplatte in Draufsicht

Fig. 3 Prinzipanordnung der Mikrotiterplatte mit Stabilisierungsplatte in seitlichen Schnittdarstellungen

Fig. 4 Prinzipanordnung der Mikrotiterplatte mit Stabilisierungsplatte und Auswurfplatte in seitlichen Schnittdarstellungen

Fig. 5 Auf Filterpapier aufgetrocknete Überstände von bluthaltigen Proben nach Entweißen in der Mikrotiterplatte mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln

Fig. 6 Präzision der Fluoreszenzmessung in der Mikrotiterplatte

Fig. 7 Unpräzision eines miniaturisierten Neugeborenen-Screening-Testes auf Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Mangel

Fig. 8 Signalthöhe und Unpräzision eines miniaturisierten Neugeborenen-Screening-Testes auf Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Mangel unter Verwendung verschiedener Entweißungsmittel.

In Fig. 1 und 2 ist eine Mikrotiterplatte 1 in Perspektivansicht und Draufsicht dargestellt, die in einem an sich be-

kannten x-y-Rastermaß 8×12 insgesamt 96 Probengefäße 2 zur Aufnahme und Behandlung von Proben mit Volumina im Mikroliterbereich besitzt. Die Mikrotiterplatte 1 besteht aus Polypropylen LM-885/30-T1480-160 und ist durch thermische Verformung (Abformung von einer Matrize) aus einer folienartigen Platine hergestellt. In diesem Abformungsprozeß wurden gleichzeitig die 96 Vertiefungen für die Probengefäße 2 in die Platine eingepreßt sowie Formstabilisierungselemente von Seitenflächen 3 und 4, Eckenabschrägungen 5 und Abstufungen 6 erzeugt. Die eingepreßten Vertiefungen für die Probengefäße 2 sind kegelformpförmig, so daß ihr oberer Durchmesser 7 größer als ihr unterer Durchmesser 8 am Boden der Analysengefäße 2 ist und Seitenwände 9 konisch ausgebildet sind (vgl. Fig. 2). Mit der kegelformpförmigen Ausbildung der Probengefäße 2 im µl-Probenvoluminabereich wird gegenüber einer bekannten Mulden- oder Kegelform eine gute und praktikable Beschickung (u. a. auch mit Filterpapierstanzen) ermöglicht. Die kleinen Höhlungen der Probengefäße 2 machen diese Untersuchungen, welche dadurch lediglich geringe Probenmengen benötigen, in jeder Hinsicht sehr vorteilhaft und wirtschaftlich.

Das Material der Mikrotiterplatte 1 ist resistent gegen organische Lösungsmittel, wie insbesondere Aceton, Acetonitril, Methanol, Butanol, Hexan und Gemischen daraus, wodurch auch eine diesbezügliche Eignung für zahlreiche Anwendungsfälle (z. B. Enteiweißung in der biochemischen und klinisch-chemischen Analytik, Naturstoffscreening, kombinatorische Chemie etc.) gegeben ist.

Ferner ist dieses Material der Mikrotiterplatte 1 lichtundurchlässig sowie nichtfluoreszierend, so daß die Anwendung für optische Analyseverfahren gegeben ist, ohne daß das Gefäßmaterial die Probenauswertung einschränkt oder beeinflußt.

Auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte 1 (siehe Fig. 2) ist eine Koordinatenkennung 10 für das Raster der Probengefäße 2 in Form von Buchstaben und Zahlen der entsprechenden Koordinate des 8×12 Probenrasters sichtbar. Diese kann beispielsweise aufgedruckt werden (Siebdruck o. ä.) bzw. gleich bei der thermischen Abformung der Mikrotiterplatte 1 mit eingepreßt werden.

Um die mechanische Formstabilität der Mikrotiterplatte 1 (gerade für sehr dünnwandige und folienartig flexible Platinausführungen) bei der Verwendung zu erhöhen, ist eine Stabilisierungsplatte 11 (Grundkörper) vorgesehen, auf welche die Mikrotiterplatte 1 aufgesetzt wird. Dazu besitzt die Stabilisierungsplatte 11 zwecks Aufnahme der Probengefäße 2 zu diesen korrespondierende Vertiefungen 12 (siehe Fig. 1). Fig. 3 zeigt die Prinzipanordnung der Mikrotiterplatte 1 mit Stabilisierungsplatte 11 in seitlichen Schnittdarstellungen (getrennter und aufgesetzter Zustand). Die Darstellung entspricht der in Fig. 2 angedeuteten Schnittebene A-B. Eine dünnwandige und damit formnachgiebige Ausführung der Probengefäße 2 (folienartige Seitenwände 9) unterstützt dabei eine form- und kraftschlüssige Passung der Probengefäße 2 in den Vertiefungen 12, was beispielsweise für einen engen Wärmekontakt bei einer Temperierung der Probengefäße 2 über die Stabilisierungsplatte 11 (in der Zeichnung nicht dargestellt) relevant ist.

Um ein praktikables Trennen der Mikrotiterplatte 1 von der Stabilisierungsplatte 11 zu ermöglichen, ist eine Auswurfplatte 13 vorgesehen, die zwei Auswurfsüfite 14 besitzt. Die Stabilisierungsplatte 11 weist zwei mit diesen korrespondierende Löcher 15 auf, durch welche die Auswurfsüfite 14 hindurchgreifen und die Mikrotiterplatte 1 zum Auswurf an ihrer Unterseite antasten. Die Schnittdarstellung von Fig. 4 entspricht dabei der in Fig. 2 angedeuteten Schnittebene C-D.

Um die universelle Verwendbarkeit der erfindungsgemäßen Mikrotiterplatte 1 für die unterschiedlichsten Probenauswertungen zu demonstrieren, sollen vier Anwendungsbeispiele mit den Zeichnungen 5–8 vorgestellt werden.

Anwendungsbeispiel 1

Fällung von Hämoglobin mit organischen Lösungsmitteln

Je ein 3 mm-Blutblättchen wird in jedes Probengefaß 2 der Mikrotiterplatte 1 placiert und mit je 20 µl 100 mM Triäthanolamin/HCl, pH 7,8 mit 0,133% (w/v) Digitonin, 0,9 mM EDTA, 0,63 mM Dithiothreitol und 0,02% NaN₃ (1 und 2 in Fig. 5) bzw. H₂O (3 und 4 in Fig. 5) zwei Stunden bei 37 °C eluiert. Danach werden die Mikrotiterplatte auf Raumtemperatur abgekühlt und in jeweils zwei Probengefäße identisch je 40 µl (1 und 3 in Fig. 5) bzw. 60 µl (2 und 4 in Fig. 5) der folgenden Lösungsmittel pipettiert: (A) Aceton, (B) Acetonitril, (C) Methanol, (D) Äthanol, (E) Propanol, (F) Isopropanol, (G) Butanol, 1/1(v/v)-Mischungen aus (H) Äthanol/Aceton, (I) Methanol/Aceton, (J) Butanol/Aceton, (K) Methanol/Äthanol, (L) Methanol/Propanol, (M) Propanol/Aceton, (N) Methanol/Isopropanol, (O) Methanol/Butanol und (P) H₂O.

Blutblättcheneluat und Lösungsmittel werden auf einem Mikrotiterplattenschüttler gemischt und bei 4000 g für 5 min zentrifugiert. 5 µl des Überstandes werden auf MN818 pipettiert und die Anwesenheit von Hämoglobin auf dem Filterpapier visuell beurteilt. Fig. 5 zeigt, daß unter allen Bedingungen nur Aceton, Acetonitril, Propanol und Methanol und 1/1-Mischungen aus Methanol/Aceton eine komplette Enteiweißung erzeugen.

Anwendungsbeispiel 2

Fluoreszenzmessung in der Mikrotiterplatte

Die Fluoreszenz jeweils aller 96 Probengefäße 2 der Mikrotiterplatte 1 werden leer, oder mit 80, 90 bzw. 100 µl eines Puffers ohne oder mit NADH oder Methylumbelliferon gefüllt bei 460 nm (Anregung 355 nm) in einem an sich bekannten Fluorimeterreader gemessen. In Fig. 6 sind Signalthöhen und Unpräzisionen dieser Messungen zusammengestellt.

Die erfindungsgemäße Mikrotiterplatte besitzt damit gegenüber herkömmlichen zur Fluorimetrie verwendeten Mikrotiterplatten aus weißem oder schwarzem Polystyrol vergleichbar gute Präzisionseigenschaften.

Anwendungsbeispiel 3

Miniaturisierter Neugeborenen-Screening-Test auf Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Aktivität

Zu jeweils einem Blutblättchen (3 mm Ø) pro Probengefaß 2 der Mikrotiterplatte 1, welches Normalblut eines erwachsenen freiwilligen Spenders oder entsprechende Verdünnungen im Eigenplasma aufgetrocknet enthält, werden 20 µl des Testgemisches pipettiert. Das Testgemisch enthält 100 mM Triäthanolamin/HCl, pH 7,8, 0,133% (w/v) Digitonin, 0,9 mM EDTA, 0,63 mM Dithiothreitol, 0,02% NaN₃ (w/v), 6,48 mM Galaktose-1-phosphat, 4,4 mM UDP-glucose, 4,82 mM NADP. Individuelle Blindwerte werden mit dem gleichen Testgemisch, aber ohne Galaktose-1-phosphat parallel mitbestimmt.

Die Mikrotiterplatte wird kurz auf einem Mikrotiterplattenschüttler geschüttelt, mit einer Klebefolie abgedeckt und zwei Stunden bei 38°C inkubiert. Danach erfolgt die Entei-

weißung durch Zugabe von 60 µl Methanol/Aceton (1/1, v/v), Schütteln und Zentrifugation bei 4000 g für 5 min. Die Fluoreszenz der Lösung in den Probengefäßen 2 wird direkt in der Mikrotiterplatte 1, welche in die Stabilisierungsplatte 11 eingedrückt ist, bei 460 nm (355 nm Anregung) im Fluorimeter gemessen. Die erhaltenen Signale (Skalenteile) und Unpräzisionen des Testes sind in Fig. 7 zusammengestellt.

Die Signalhöhen übersteigen diejenigen, die bei herkömmlichen Tests mit größeren Volumina erreicht werden um das 5–10-fache. Die erreichten Präzisionen machen den Test für Screeningzwecke gut geeignet.

Anwendungsbeispiel 4

Test auf Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Aktivität unter Verwendung verschiedener Enteiweißungsmittel

Der miniaturisierte Test wird wie in Anwendungsbeispiel 3 durchgeführt, jedoch verschiedene Lösungsmittel als Enteiweißungsreagenz mit einem Volumen von 40 bzw. 60 µl eingesetzt: Es werden jeweils 6 Proben in einer Serie gleichermaßen behandelt.

60 µl Testpuffer: Aceton/Methanol (1/1), Äthanol, Methanol, Aceton, Propanol, Acetonitril;
40 µl Äthanol.

Die erreichten Fluoreszenzen und Unpräzisionen sind in Fig. 8 zusammengestellt.

Es ist zu sehen, daß die Lösungsmittel Methanol und Aceton/Methanol (1/1), die komplett enteiweißen (vgl. Fig. 5), auch die höchsten Test-Fluoreszenzsignale bei guten Testpräzisionen ermöglichen. Propanol, Acetonitril und Aceton führen zu einer Verminderung der NADPH-Fluoreszenz. Testpuffer und Äthanol entfernen das störende Hämoglobin nicht bzw. nur unvollständig.

Bezugszeichenliste

1 Mikrotiterplatte	
2 Probengefäß	
3, 4 Seitenfläche	40
5 Eckenabschrägung	
6 Abstufung	
7, 8 Durchmesser	
9 Seitenwand	
10 Koordinatenkennung	45
11 Stabilisierungsplatte	
12 Vertiefung	
13 Auswurfplatte	
14 Auswurfstift	
15 Loch	50

Patentansprüche

1. Mikrotiterplatte, insbesondere zur Behandlung von Proben mit organischen Lösungsmitteln und zur Analyse mittels lichterzeugender Verfahren, mit in einem an sich bekannten Raster, beispielsweise $n \times m \times 12$, angeordneten Probengefäßen, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikrotiterplatte (1) aus lichtundurchlässiger, nichtfluoreszierender und gegen organische Lösungsmittel resistenter formnachgiebiger Thermoplaste, wie thermisch verformbarem Polypropylen, besteht und daß die, vorzugsweise durch thermische Verformung hergestellten, Probengefäße (2), kegelstumpfförmig zur Aufnahme von festen und flüssigen Proben im Mikroliter-Voluminabereich ausgebildet sind.
2. Mikrotiterplatte nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Thermoplaste mit colorierten Pig-

menten versehen ist.

3. Mikrotiterplatte nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikrotiterplatte (1) Mittel (3, 4, 5, 6) zur Erhöhung der Formstabilität, wie beispielsweise Seitenflächen, Wülste, Stufen, Falze, Sicken, Abschrägungen u.ä. vorgesehen sind.

4. Mikrotiterplatte nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte (1) eine Koordinatenkennung (10) für das Raster der Probengefäße (2) angegeben ist.

5. Mikrotiterplatte nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Koordinatenkennung (10) ebenfalls durch thermische Verformung in die Oberfläche der Mikrotiterplatte (1) eingepreßt ist.

6. Mikrotiterplatte nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Stabilisierungsplatte (11) vorgesehen ist, die zu den als Vertiefungen der Mikrotiterplatte (1) ausgebildeten Probengefäßen (2) korrespondierende Aufnahmevertiefungen (12) besitzt, in welche die Probengefäße (2) der Mikrotiterplatte (1) form- und kraftschlüssig eingesetzt werden.

7. Mikrotiterplatte nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Stabilisierungsplatte (11) Mittel zur Temperierung besitzt, z. B. eine interne elektrische Heizspirale, oder mit solchen in Verbindung steht, z. B. zu einem Flüssigkeitsbad.

8. Mikrotiterplatte nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Auswurfplatte (13) vorgesehen ist, die mindestens zwei Auswurfstifte (14) besitzt, welche zum Auswurf der Mikrotiterplatte (1) aus der Stabilisierungsplatte (11) durch korrespondierende Löcher (12) der Stabilisierungsplatte (11) hindurchgreifen und die Mikrotiterplatte (1) von der Unterseite antasten.

Hierzu 8 Seite(n) Zeichnungen

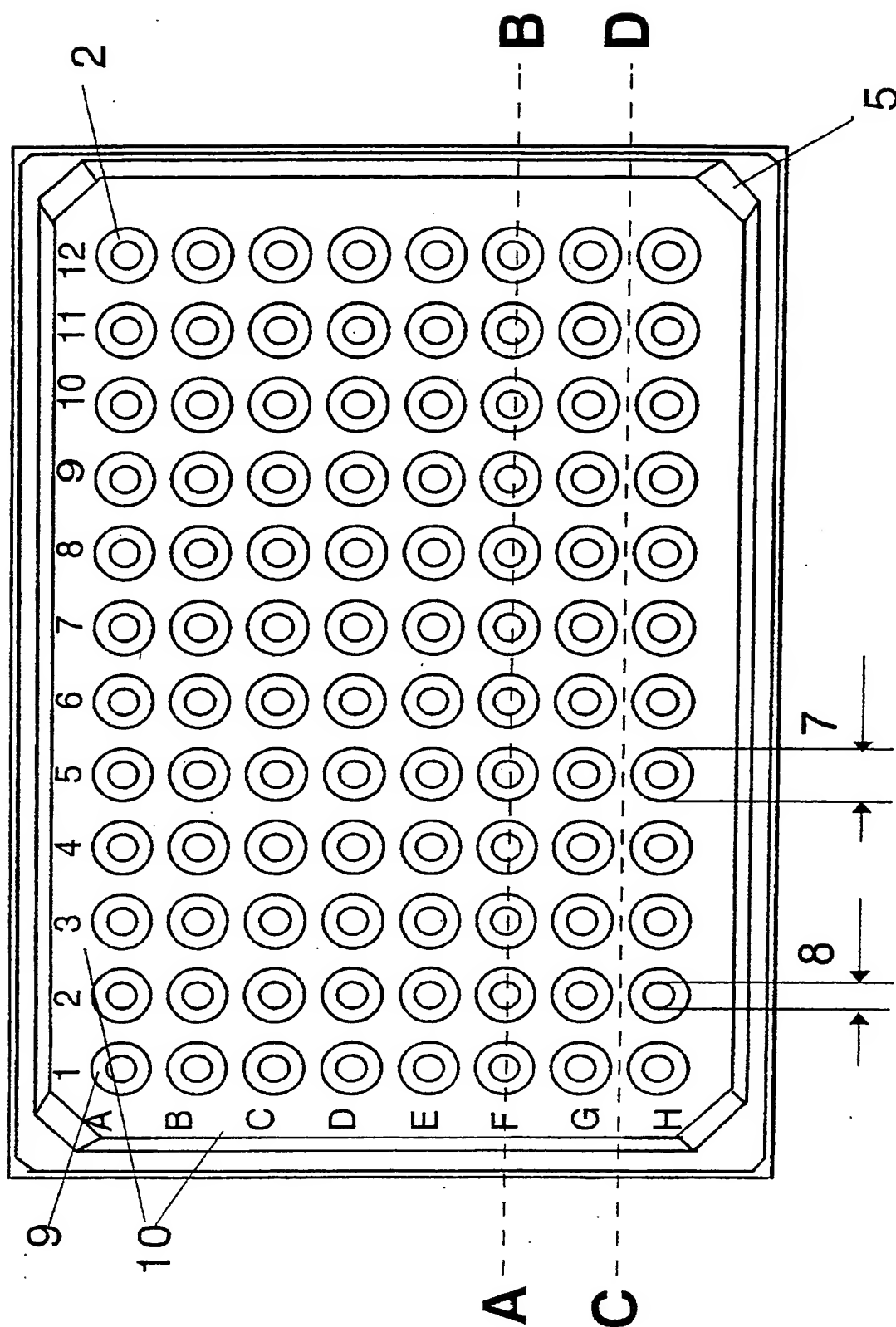


Fig. 2

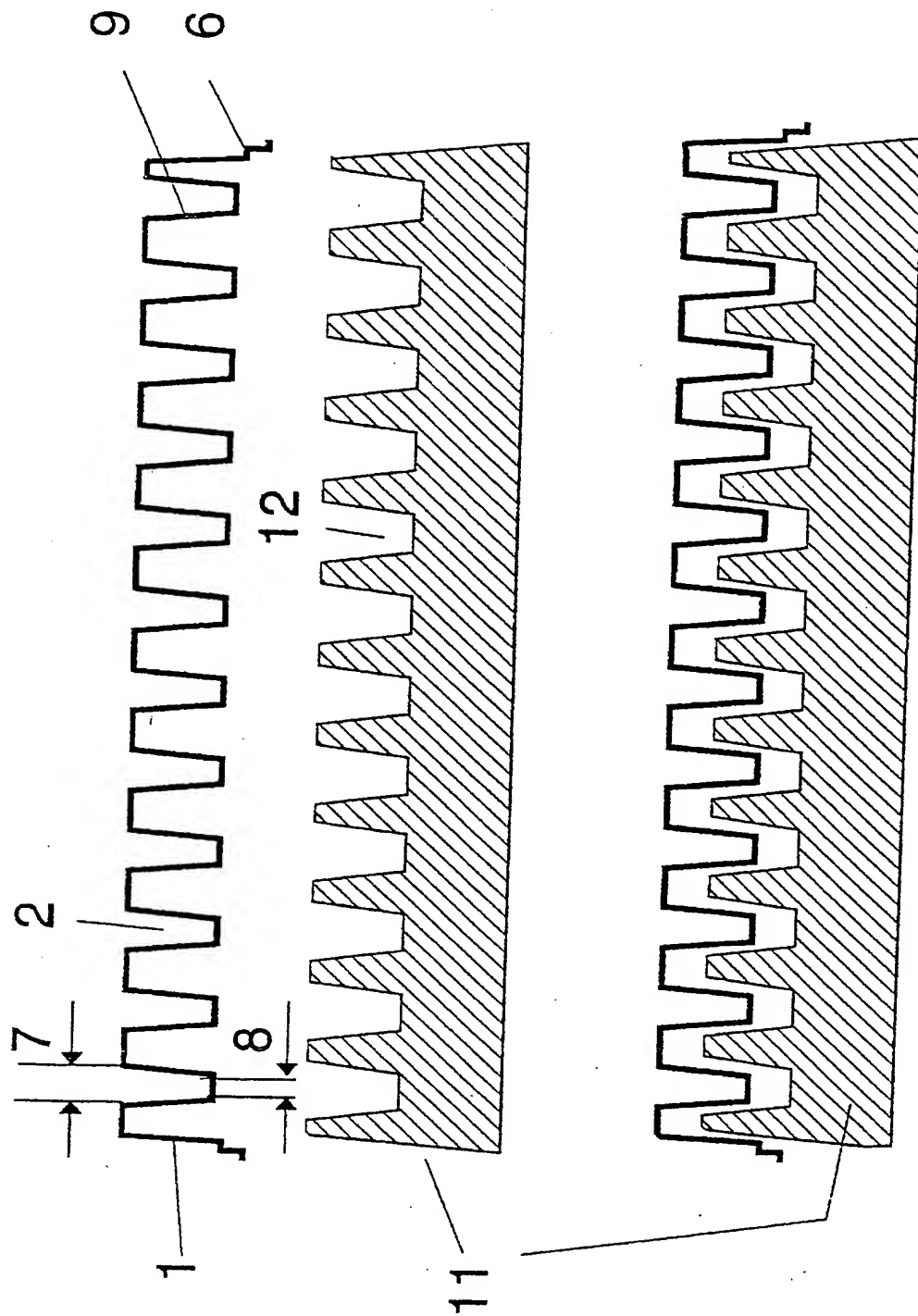
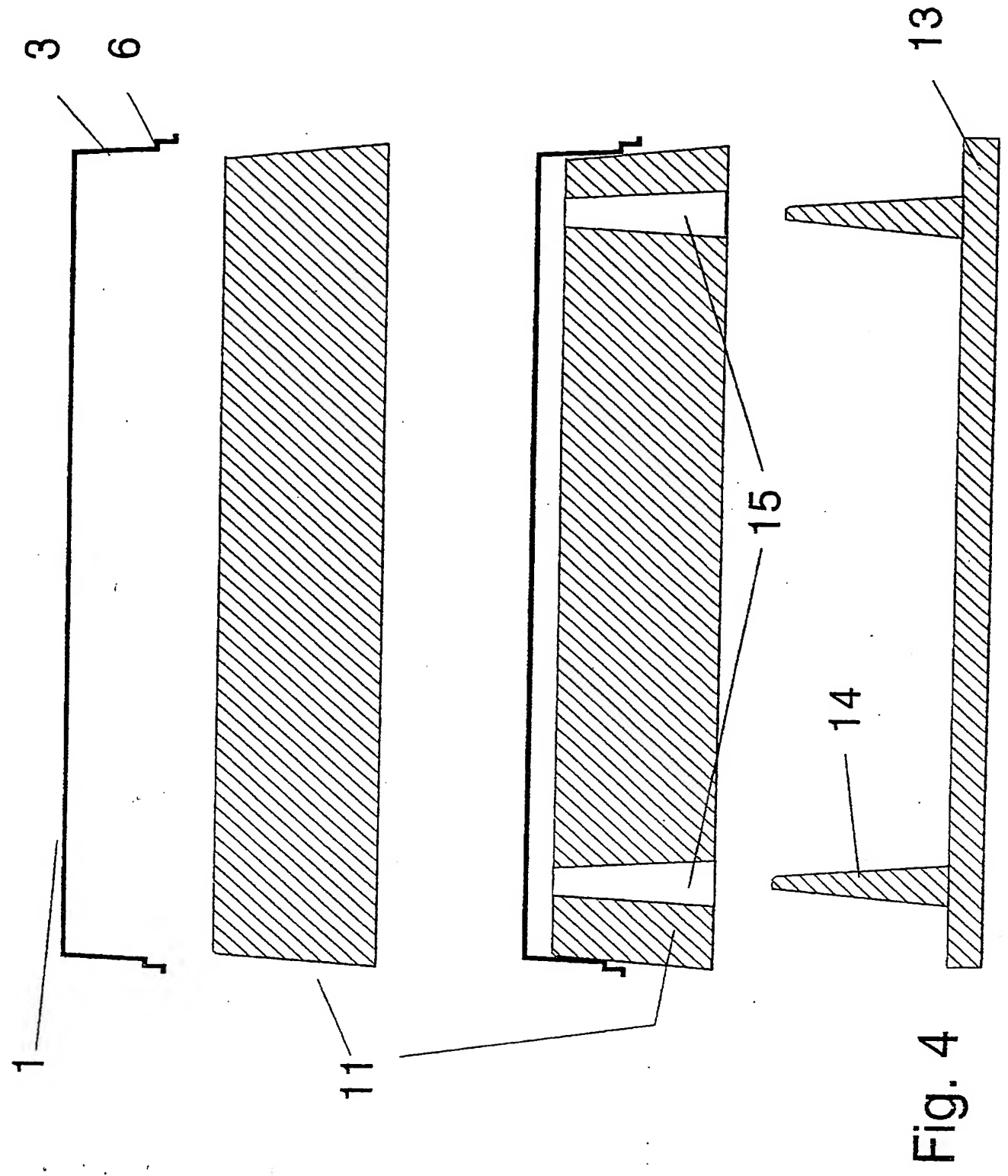


Fig. 3



THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

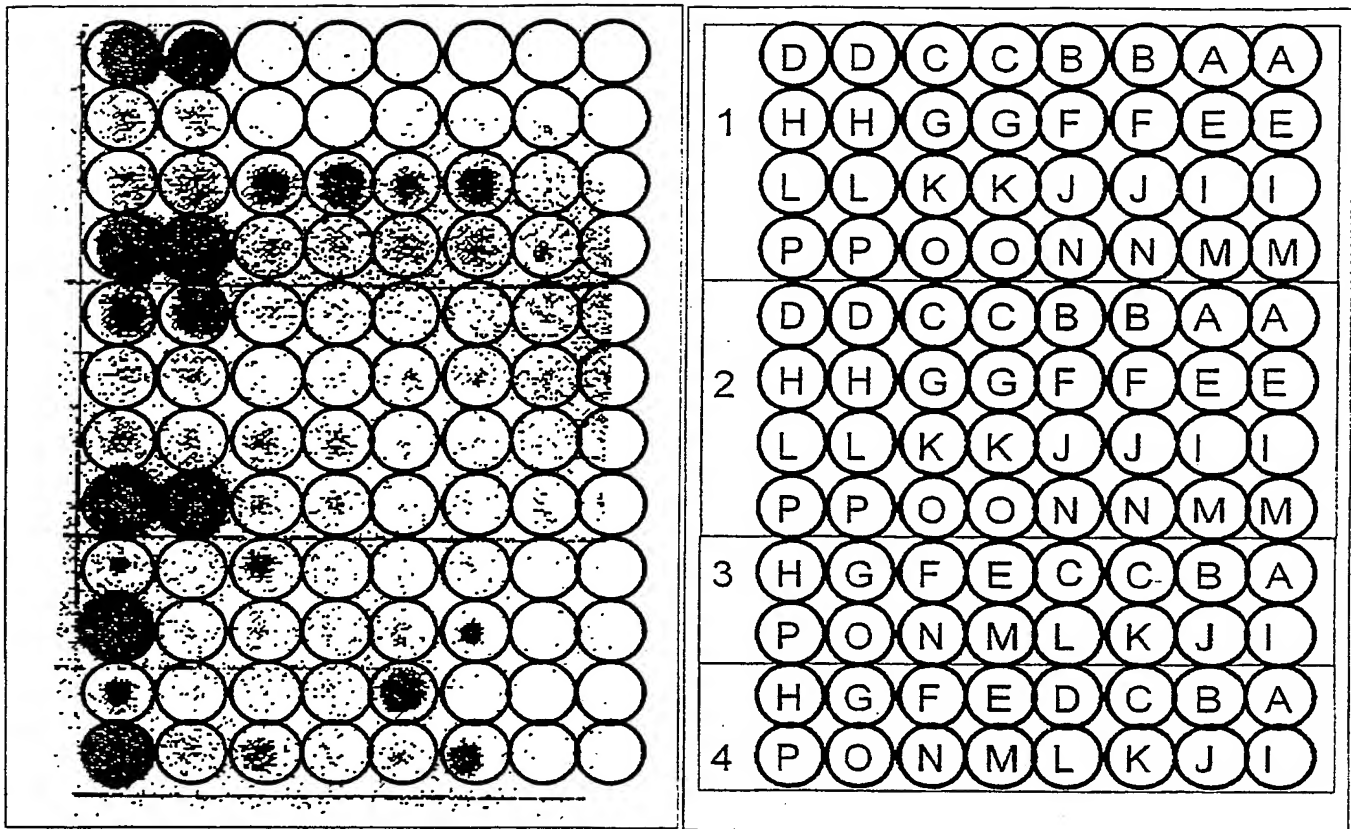


Fig. 5

	Fluoreszens (Mittel) ± Standardabweichung	VK (%)	Anzahl der Platten (z)
leer	2,22 ± 0,19		6
100 µl A	3,69 ± 0,31		3
0,4 mM NADH in A			
100 µl	523,73 ± 6,91	1,32	3
90 µl	525,79 ± 7,65	1,45	3
80 µl	525,5 ± 7,77	1,47	3
0,2 mM NADH in A, 100 µl	477,8 ± 8,46	1,77	1
0,1 mM NADH in A, 100 µl	360,1 ± 5,94	1,65	3
Methylumbelliferon in B, 100 µl			
2,5 µM	2637,3 ± 51,69	1,96	1
5,0 µM	5823,65 ± 120,55	2,07	2

A: 100 mM Triäthanolamin/HCl pH 7,8, B: 1 M Diethanolamin/HCl pH 9,8.
 Fluoreszenzwerte sind die Mittel und Standardabweichungen von n
 (n = z x 96), VK: Mittel der Variationskoeffizienten aller z Einzel-VK der
 gemessenen Platten;

Fig. 6

a: Intra-assay-Unpräzision:

GALT-Aktivität	Fluoreszens (Mittel)	VK (%)	n
0 (Galaktosämie)	8.84	12.56	12
verdünntes Normalblut	37.84	11.17	20
verdünntes Normalblut	116.58	7.55	21
verdünntes Normalblut	169.35	6.80	21
Normalblut	188.17	7.03	21
Blindwert vom Normalblut	8.15	8.36	21

b: Inter-assay-Unpräzision:

GALT-Aktivität	Fluoreszens (Mittel)	VK (%)	n
0 (Galaktosämie)	8,2	19,3	12
verdünntes Normalblut	37,63	17,2	12
verdünntes Normalblut	107,84	7,8	12
verdünntes Normalblut	150,78	8,1	12
Normalblut	186,32	4,3	12

Fig.7

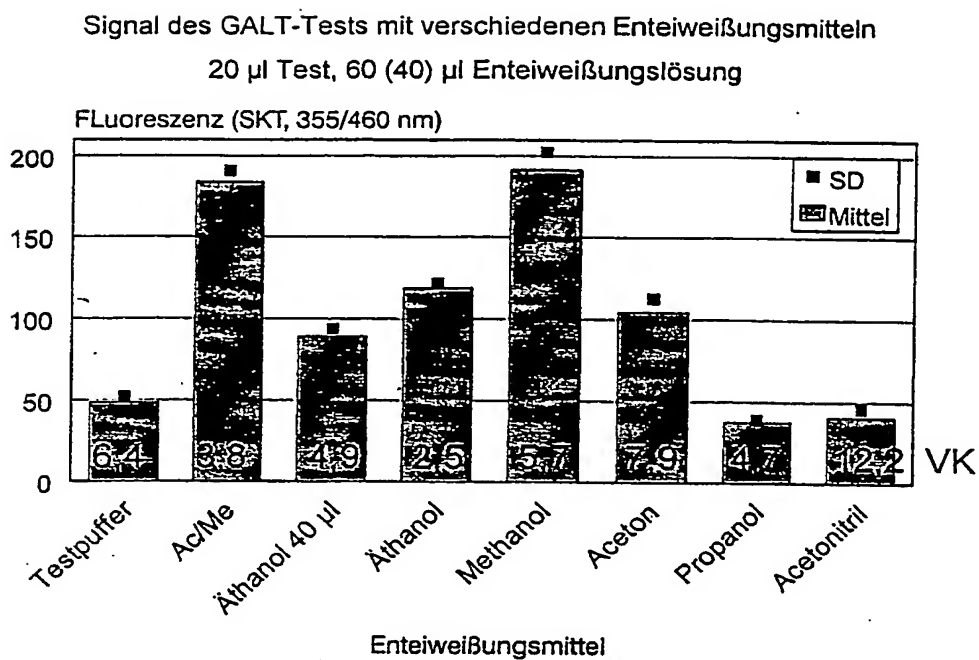


Fig. 8

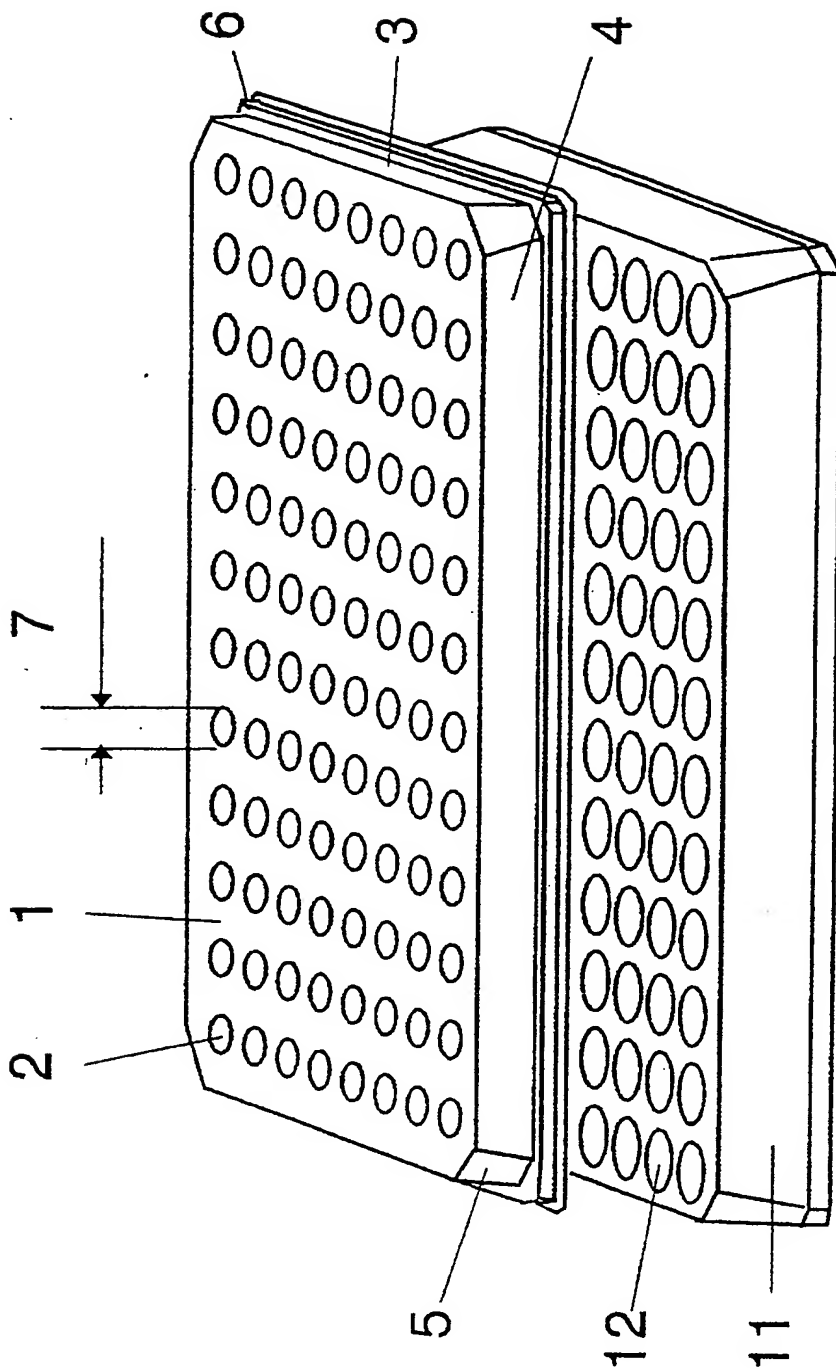


Fig. 1

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK COPY